

M23 - PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS AROMÁTICOS VARIETALES POR CEPAS DE BACTERIAS LÁCTICAS AUTÓCTONAS A PARTIR DE UN EXTRACTO DE PRECURSORES GLICOSILADOS DE UVA BLANCA

**Testa, B.¹, Muñoz-González, C.², García-Ruiz, A.²; Pozo-Bayón, M.A.², Lombardi, S.J.¹,
Iorizzo, M.¹, Moreno-Arribas M. V.²**

¹University of Molise, Department of Agricultural Environmental and Food Sciences, De Sanctis avenue snc 86100 Campobasso, Italy. ²Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL) (CSIC-UAM), Departamento de Biotecnología y Microbiología de Alimentos, C/Nicolás Cabrera 9, 28049, Madrid.
victoria.moreno@csic.es

RESUMEN:

Los precursores glicosídicos del aroma son compuestos inodoros que se encuentran de forma natural en las uvas y que representan un reservorio natural de moléculas odorantes en el vino. Durante la elaboración del vino, se busca la liberación de las correspondientes agliconas (volátiles y odorantes), que se caracterizan por tener bajos umbrales de percepción y propiedades sensoriales muy interesantes, características de la variedad. En este trabajo, se ha evaluado la capacidad de 11 cepas de bacterias lácticas enológicas (*Lactobacillus plantarum*) de liberar compuestos aromáticos varietales a partir de precursores glicosidos de la uva. Las cepas bacterianas se han aislado de vinos tintos y tipificado mediante el uso de técnicas moleculares (PFGE, RAPD y secuenciación 16S rRNA) y de espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF-MS, comprobándose además la no producción de aminas biógenas. Se ha comprobado la actividad glicosidasa de estas cepas mediante el empleo de un glicósido comercial n-octilglicósido, siendo dicha actividad de aproximadamente el 100% desde el mismo momento de inoculación (tiempo 0) de las cepas bacterianas con el glicósido. La potencial eficacia tecnológica de estas bacterias se ha confirmado sobre un extracto de precursores glicosidos obtenido a partir de uva blanca, demostrándose para la cepa *L. plantarum* CIAL-M28 valores de actividad glicosidasa superiores al 80% en tiempos muy cortos.

Palabras clave: *Lactobacillus plantarum*, vino, fermentación maloláctica, aroma, uva, compuestos volátiles varietales, precursores glicosilados, aromas frutales, terpenos

1. Introducción

En las uvas, los compuestos del aroma se encuentran fundamentalmente como glicósidos conjugados con azúcares, es decir, no están en forma libre y, por lo tanto, no son odorantes. Se estima que la concentración de estos precursores del aroma glicosilados es entre dos y ocho veces mayor que la de sus homólogos libres y, aunque su distribución en la baya de uva puede cambiar durante la madurez, están presentes en mayor cantidad en la piel de las uvas. Durante la elaboración del vino, se busca la liberación de las correspondientes agliconas (volátiles y odorantes), que son compuestos muy relevantes para las características de los vinos (i.e. monoterpenos, norisoprenoides, compuestos benzenoides, etc) ya que se caracterizan por tener bajos umbrales de percepción y propiedades sensoriales muy

interesantes, que confieren a los vinos aromas característicos de la variedad de uva (i.e. aromas frutales).

Las enzimas responsables de la hidrólisis enzimática de los glicósidos son las glicosidasas. En el vino, las bacterias lácticas son responsables del proceso de fermentación maloláctica, y aunque la principal especie implicada es *Oenococcus oeni*, en la actualidad existe un interés creciente en la selección y caracterización de las propiedades metabólicas de cepas de la especie *Lactobacillus plantarum*. Actualmente, las glicosidasas comerciales más empleadas en enología proceden del hongo *Aspergillus niger*. Estas glicosidasas comerciales se caracterizan por mostrar poca inhibición en presencia de azúcares (glucosa), pero manifiestan problemas derivados de actividades enzimáticas colaterales (antocianinas, polifenol-oxidasas).

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar el potencial de las bacterias lácticas del vino, y más concretamente de cepas de la especie *L. plantarum*, para hidrolizar precursores glicosídicos de la uva y liberar las correspondientes agliconas aromáticas y con ello, la consiguiente mejora de la calidad sensorial del vino.

2. Material y métodos

Se han estudiado un total de 65 cepas de *L. plantarum* aisladas de 28 vinos, incluyendo vinos españoles y procedentes del sur de Italia, durante la fermentación maloláctica (FML) espontánea. Las cepas bacterianas pertenecen a la colección del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL) y al Departamento de Agricultura y Ciencias de Alimentos de la Universidad de Molise, y se han tipificado mediante el uso de técnicas moleculares (PFGE, RAPD y secuenciación 16S rRNA), y de espectrometría de masas, MALDI TOF/TOF-MS.

El primer panel de selección, se realizó en el medio sintético propuesto por Carreté et al. [1] (4 gL⁻¹ de extracto de levadura, 2 gL⁻¹ de glicerol, 6 gL⁻¹ de ácido D,L-málico) en presencia de 14% (v/v) de etanol a pH 3,5 (medio SW). Las células cultivadas en fase exponencial en MRS durante 48 h a 28 °C, se lavaron con solución fisiológica y se resuspendieron en medio SW a la concentración final de 10⁸ CFU mL⁻¹. El número de células viables se midió en placas a diferentes tiempos (5, 10, 15 días) de incubación a 30 °C. Se seleccionaron 11 cepas que mostraron las mejores características, que se evaluaron en un segundo panel de selección, para determinar su capacidad de crecer y llevar a cabo la FML en vinos. Los recuentos de células se controlaron a cuatro etapas diferentes durante la FML (0, 10, 15, 20 días) mediante la realización de recuentos de placas en placas de agar MRS que se incubaron a 30 °C. La concentración de ácido L-málico se determinó mediante un kit enzimático (Steroglass, Italia). Durante la incubación a 30 °C durante 15 días, se tomaron muestras a diferentes intervalos de tiempo y el número de células viables se determinó en placas a partir de alícuotas del medio SW diluidas en medio agar MRS.

La capacidad de hidrolizar precursores glicosídicos de estas cepas, se evaluó mediante el empleo de un glicósido comercial n-octilglicósido (5 ppm) y evaluación de la aglicona correspondiente, 1-octanol, y un extracto de precursores glicósidos obtenido a partir de uva blanca siguiendo la metodología descrita por Rodríguez-Bencomo et al. [2]. Los caldos de cultivo overnight de *L. plantarum* se inocularon con el extracto y se incubaron a 30° C. Para aislar las agliconas odorantes, se llevó a cabo una extracción y concentración empleando la técnica de microextracción en fase sólida del espacio de cabeza (HS-SPME), y los compuestos odorantes se analizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (GC-MS). A los resultados obtenidos se les aplicaron diferentes tratamientos estadísticos.

La capacidad de producir aminas biógenas (histamina, metilamina, etilamina, tiramina, feniletilamina, putrescina y cadaverina) de las cepas de *L. plantarum* seleccionadas se determinó por RP-HPLC siguiendo el método descrito por Marcobal et al. [3] en experimentos

en medio de cultivo MRS conteniendo los aminoácidos precursores correspondientes. Todas las determinaciones se realizaron al menos por duplicado.

3. Resultados

En una primera etapa, 65 aislados de *L. plantarum* se sometieron a un ensayo de cribado, primero para evaluar su resistencia usando un medio sintético similar al vino, vino sintético (SW), con un pH de 3.5 y un contenido de etanol de 14% (v/v). Posteriormente se seleccionaron las cepas más resistentes a estas condiciones, que se evaluaron en un ensayo comparativo de rendimiento en la fermentación maloláctica a escala de laboratorio (microvinificaciones) utilizando el mismo medio, el vino sintético, pero con diferente valor de pH y concentración de etanol. Esto permitió seleccionar 11 cepas de *L. plantarum* que mostraron una buena capacidad de degradar el ácido L-málico en poco tiempo (entre 5 y 20 días) (Figura 1), la prueba más significativa se obtuvo en el vino sintético a pH 3.2 con un contenido en etanol de 13% (v/v).

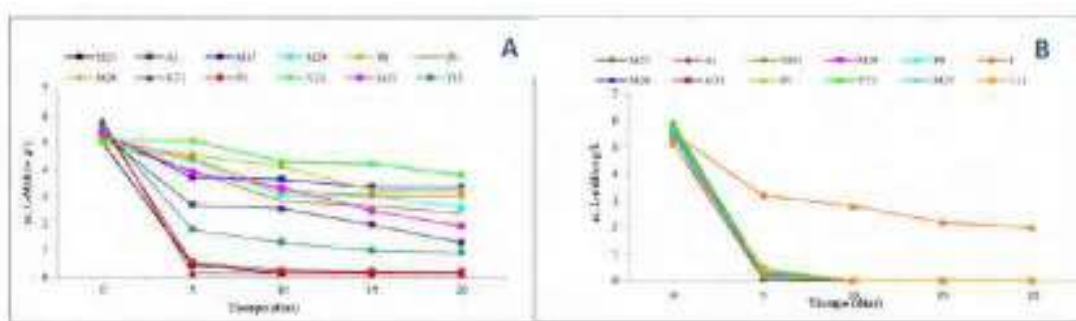


Figura 1. Degradación del ácido málico por las cepas de *L. plantarum* estudiadas. a) vino sintético a pH 3.2 y 13 % etanol (v/v), b) vino sintético a pH 3.5 y 13 % etanol (v/v)

A continuación se evaluó la actividad glicosidasa de estas cepas mediante el empleo de un glicósido comercial n-octilglicósido, evaluándose la actividad mediante la liberación de la aglicona correspondiente (1-octanol). Como se muestra en la tabla 1, todas las bacterias producen hidrólisis del glicosido comercial, siendo las cepas M17 y M28 las mayores productoras de 1-octanol. Posteriormente, la potencial eficacia tecnológica de estas bacterias se ha confirmado sobre un extracto de precursores glicosídicos obtenido a partir de uva blanca. Los resultados obtenidos con el extracto glicosídico de uva, mostraron que, en general, todas las bacterias estudiadas eran capaces de hidrolizar los precursores glicosídicos, liberando diferentes familias de agliconas aromáticas, que incluían terpenos, derivados bencénicos y alcoholes. En general, la liberación de agliconas es dependiente de la cepa bacteriana, comprobándose que *L. plantarum* CIAL-M28 es la mayor liberadora de terpenos como el linalol, relacionado con notas florales en los vinos, con valores de actividad glicosidasa superiores al 80% en tiempos muy cortos (resultados no mostrados).

Finalmente, en las 11 cepas seleccionadas de *L. plantarum* se evaluó la capacidad para producir aminas biogénas mediante RP-HPLC, comprobándose que ninguna de las cepas estudiadas producía las aminas histamina, metilamina, etilamina, tiramina, feniletilamina, putrescina y cadaverina, un aspecto fundamental en relación a la seguridad y protección de la salud de los consumidores, con vistas a la producción de un posible starter de bacterias lácticas para ser utilizado como iniciador de la fermentación maloláctica.

Tabla 1. Media y SD del 1-octanol (áreas absolutas) liberado por las diferentes cepas de *L. plantarum* tras la incubación con el glucósido comercial (n-octilglicósido)

Cepas	Mean	SD
control	0	0,00
A1	1374998	182665
GT1	1470788	223690
M17	1829973	99960
M25	1553906	18674
M27	1008713,5	29482
M28	1968063	2923
M29	1251022,5	71640
P1	947318	78966
P5	1291737	80423
P6	1605336	39610
T1	1260149,5	30652

4. Conclusiones

Los estudios de la caracterización tecnológica han demostrado la capacidad de las once cepas de *L. plantarum* seleccionadas para adaptarse y desarrollarse en el vino a valores bajos de pH; así como su alta tolerancia al etanol. Los estudios del metabolismo han puesto de manifiesto la notable capacidad de algunas cepas de degradar el ácido L-málico de una manera completa y en un tiempo muy corto. Otro aspecto importante destacado de este trabajo es que ninguna de las cepas estudiadas produce aminas biógenas. Los resultados de actividad glicosidasa mostraron que todas las cepas son capaces de hidrolizar glicósicos precursores de aroma presentes en las uvas, liberando diferentes compuestos odorantes que se caracterizan por presentar notas aromáticas agradables y bajos umbrales de percepción. Esta actividad es especialmente relevante en la cepa *L. plantarum* CIAL-M28. En conjunto, los resultados obtenidos permiten disponer de una colección de cepas enológicas con potencial como iniciadores malolácticos y con propiedades que contribuyen a la mejora de la composición y la calidad del vino, específicamente en lo referente a la liberación de monoterpenos volátiles muy importantes para potenciar las características sensoriales de los vinos.

5. Bibliografía

1. Carrete, R., Vidal, M.T., Bordons, A. (2002). Inhibitory effect of sulphur dioxide and other stress compounds in wine on the ATPase activity of *Oenococcus oeni*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 211, 155-159
2. Rodríguez-Bencomo, J. J., Selli, S., Muñoz-González, C., Martín-Álvarez, P. J., Pozo-Bayón, M. A. (2013). Application of glycosidic aroma precursors to enhance the aroma and sensory profile of dealcoholised wines. *Food Res. Int.* 51, 450-457
3. Marcobal, A.; Polo, M.C.; Martín-Álvarez, P.J.; Moreno-Arribas, M.V. (2005) Biogenic amines content of red Spanish wines. Comparison of a Direct ELISA and an HPLC method for the determination of histamine in wines. *Food Res Int.* , 38, 387-394

6. Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación recibida del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) a través de los proyectos PRI-PIBAR 2011-1358 y AGL2012-40172-C02-01.